A PROPOS DE DEUX TYPES D'ANOMALIES OBTENUES CHEZ *PLEUROTUS ERYNGII* (D.C. ex FR.), QUÉLET, EN CULTURE

par A.M. SLEZEC*

SUMMARY. — Study of the variability of basidiocarps formed in vitro by mating of haploid strains. Karyologic studies of two morphologic abnormalities. In the first type no primordium is differentiated. In the second, the initiated primordia do not achieve their complete morphologic development. Nevertheless, the nuclear evolution of young basidia is completed.

RÉSUMÉ. — Chez *Pleurotus eryngii* (D.C. ex Fr.) Quél., on observe une variabilité de la morphologie des basidiocarpes produits en culture in vitro, à partir de dicaryons obtenus par croisement d'haplontes compatibles. Deux types d'anomalies sont apparues plusieurs fois dans les mêmes conditions; ils sont donc reproductibles et ont fait l'objet d'une étude caryologique tout au long de leur évolution. Les résultats obtenus montrent que l'une des déviations par rapport au schéma normal de l'évolution des carpophores in vitro, se manifeste au niveau du mycélium dicaryotique, qui ne montre jamais de différenciation en primordium. L'autre anomalie se situe après la mise en place des primordiums qui ne terminent pas leur développement morphologique, sans qu'il y ait pour autant arrêt total dans l'évolution nucléaire des jeunes basides.

Pleurotus eryngii (D.C. ex Fr.) Quél., étroitement lié dans la nature à l'*Eryngium campestre*, produit au laboratoire des carpophores normaux et fertiles sur les mycéliums obtenus soit par semis multispores, soit par bouturage, lorsque certaines conditions de substrat et d'environnement sont respectées (CAILLEUX et DIOP, 1976, 1978) (Planche I).

* Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle, 12 rue de Buffon, 75005 Paris. — L.A. n° 257 (CNRS).

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE *(Cryptog., Mycol.)* TOME 2 (1981).

Il en va tout différemment si des mycéliums dicaryotiques, résultant de la confrontation d'haplontes compatibles, sont mis à fructifier dans les mêmes conditions contrôlées.

Alors que certains d'entre eux produisent normalement des carpophores, d'autres restent indéfiniment à l'état mycélien, sans trace de différenciation morphologique, même rudimentaire, ni de modification du stock nucléaire. D'autres enfin, ne forment que des basidiocarpes «abortifs».

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel utilisé est la souche 1336, originaire de la région de Millau (Aveyron) qui produit depuis plusieurs années au laboratoire des carpophores normaux et fertiles, selon les méthodes préconisées par CAILLEUX et DIOP (1976, 1978).

Les spores produites par les carpophores cultivés in vitro sont recueillies sur lames de verre stériles. Stockées en chambre froide à 4°C, elles gardent leur pouvoir germinatif environ 4 mois. Les mycéliums issus des spores sont cultivés sur milieu de ODDOUX (1955) réparti en tubes de verre et gardés à 4°C.

Les haplontes, issus de la germination des spores de cette souche, sont répartis en quatre groupes de polarité (Tableau 1, moitié supérieure).

Les dicaryons obtenus par confrontation d'haplontes complémentaires sont mis à fructifier et les résultats obtenus sont reportés dans le même tableau, moitié inférieure. Le tableau 2 rend compte des différentes cultures mycéliennes étudiées plus particulièrement tout au long de leur développement.

Ces différents essais ont été répétés trois fois, et pour chacun d'eux, la souche témoin 1336 (mycélium d'origine polysperme) était aussi mise à fructifier, à titre de comparaison.

Nous avons étudié, du point de vue morphologique et caryologique, l'aspect et la structure des mycéliums (tous les haplontes et tous les diplontes) et des basidiocarpes, tant normaux qu'«abortifs».

Les différentes méthodes cytologiques employées sont celles décrites par BOIDIN (1958).

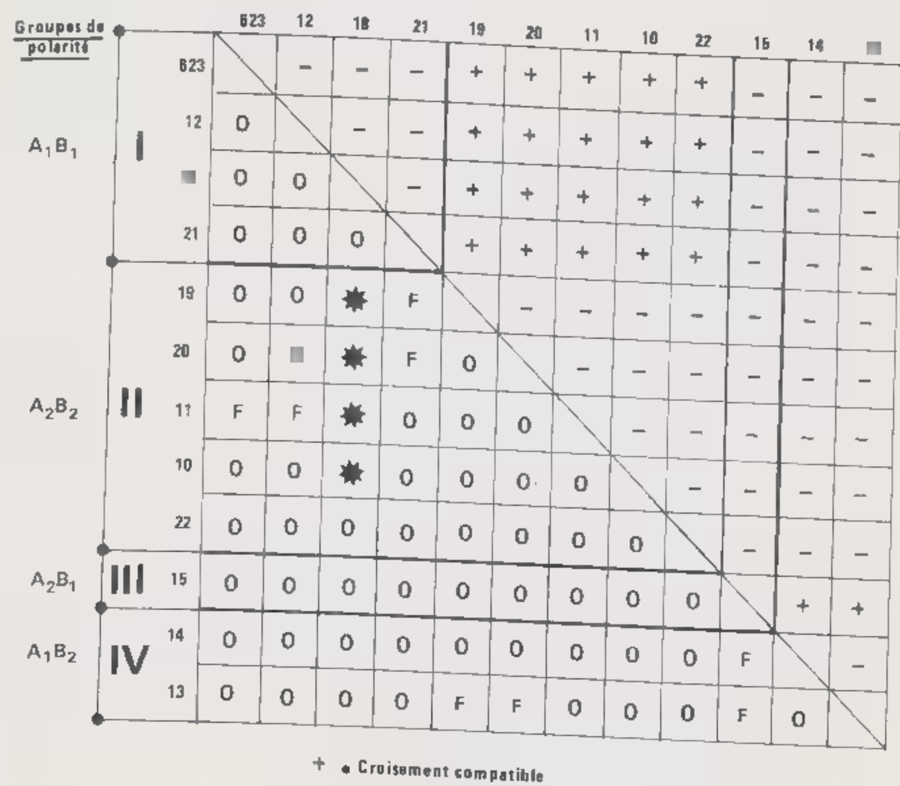
RÉSULTATS

Les mycéliums

Les cultures impliquées dans cette étude (Tabl. 2 et pl. 4), ont été suivies tout au long de leur évolution.

- Tantôt, le mycélium est luxuriant, envahissant en partie ou totalement la boîte de Pétri ou le tube, donnant ainsi l'impression d'une masse cotonneuse compacte. C'est le cas des haplontes 611, 620, 622 et 623 et des diplontes 1336, 611 x623 et 622 x 623 (Pl. 4). La croissance mycélienne est régulière

TABLEAU I



Groupes de polarité			623	12	18	21	19	20	11	10	22	15	14	■
A_1B_1	I	623		−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−
		12	0		−	−	+	+	+	+	+	−	−	−
		■	0	0		−	+	+	+	+	+	−	−	−
		21	0	0	0		+	+	+	+	+	−	−	−
A_2B_2	II	19	0	0	✸	F		−	−	−	−	−	−	−
		20	0	■	✸	F	0		−	−	−	−	−	−
		11	F	F	✸	0	0	0		−	−	−	−	−
		10	0	0	✸	0	0	0	0		−	−	−	−
		22	0	0	0	0	0	0	0	0		−	−	−
A_2B_1	III	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0		+	+
A_1B_2	IV	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	F		−
		13	0	0	0	0	F	F	0	0	0	F	0	

+ = Croisement compatible
− = Croisement incompatible
F = Fructification normale
✸ = Fructification abortive
0 = État mycélien

Tableau 1. — Moitié supérieure: Mise en place des quatre groupes de polarité par confrontation deux à deux, de douze haplontes, chez *Pleurotus eryngii*. Moitié inférieure : Résultats des fructifications obtenues in vitro, à partir des croisements précédents : (622 x 623): blocage à la nouaison; (618 x 619) et (618 x 620): blocage au stade morphologique correspondant à la caryogamie chez les basidiocarpes à développement complet.

et le front mycélien progresse de 15 à 20 mm par semaine. Les hyphes sont régulièrement cloisonnées en articles de longueur variable (60-80μm x 3-5μm), ramifiées à angle aigu. Les articles mycéliens diploïdes sont binucléés et pourvus, au niveau des cloisons, de «boucles» ou anses d'anastomose (Pl. 4, fig. 14).

Nous avons remarqué chez l'homocaryon 623 et le dicaryon 618 x 620, la présence de rameaux mycéliens particuliers: les hyphes acrémoniformes, identiques à celles décrites par D. LAMOURE (1958) et R. HEIM (1958) (Pl. 4, fig. 15).

- Dans d'autres cas, le mycélium aérien est presque nul, les rares hyphes aériennes sont alors ténues, arachnoïdes ou très courtes. Les cultures 618, 619 et 618 x 619, 618 x 620 extériorisent ce type de développement. La croissance est lente, le front mycélien ne progresse que de 5 à 10 mm par semaine. Les hyphes sont grêles, cloisonnées en articles courts (10-50μm x 2-3μm); certaines se fragmentent en cellules de forme et de taille variées, uni- ou plurinucléées (Pl. 4, fig. 12 et 13) : les oïdies. Seul, l'haplonte 618 présente une telle désarticulation. Cependant, en présence d'un haplonte complémentaire, il perd cette aptitude et forme, avec celui-ci, un mycélium dicaryotique typique. Toutefois, les fructifications obtenues sont toujours «abortives» (Pl. 3, fig. 3, 4, 5 et 6).

Les fructifications

a) *les fructifications normales*

L'étude histologique des fructifications normales (Pl. 2) montre, chez *Pleurotus eryngii*, un type de morphogenèse diffuse (REIJNDERS, 1968), connu chez de nombreuses Aphyllophoralles.

Chez les espèces dépourvues de voile, les hyphes primordiales s'agrègent pour former l'ébauche de carpophore ou de primordium, la marge étant la zone de croissance. Dès le début de la mise en place du stipe, les hyphes prennent une direction longitudinale, généralement parallèle, puis divergent pour former le pileus. FAYOD (1889) et MAGNUS (1906) ont montré que, chez ces espèces à carpogenèse diffuse, la sporulation commençait très tôt et, bien souvent, avant l'allongement maximum des lames, ce que nous avons vérifié en établissant la chronologie des événements méiotiques (1980).

b) *les «anomalies» de fructification*

TABLEAU II

EVOLUTION DES CULTURES

culture mycelienne	J - 1	Jo	J + 1	J + 4	J + 8
1336	Mycelium dicaryotique	"Nouaison"	Primordiums	Jeunes fructifications	fructifications adultes
611 x 623	-	-	-	-	-
622 x 623	-	-	"Nouaison"	"Nouaison"	Pas de fructifications
618 x 619 618 x 620	-	-	Primordiums	fructifications "abortives"	fructifications "abortives"

Tableau 2. — Trois types de fructifications obtenues in vitro (622 x 623, 618 x 619 et 618 x 620), présentent un développement morphologique «anormal». Ils sont comparés à la souche témoin (1336) reproduite soit par semis multispores soit par confrontation d'haplontes compatibles (611 x 623).

Les différents essais réalisés avec les diplontes 622 x 623 (Pl. 3) n'ont abouti qu'à la formation d'agrégats mycéliens.

Dans ce type de blocage dit «à la nouaison», le mycélium est constitué exclusivement d'hyphes dicaryotiques typiques (Pl. 4, fig. 14), sans aucune orientation préférentielle, telle qu'on l'observe chez le témoin. L'apex de ces formations présente des images cytoplasmiques et nucléaires anarchiques, sans qu'il soit possible d'en préciser la cause.

Chez ce type d'arrêt de croissance, il n'existe aucune évolution cellulaire au-delà de la mise en place du dicaryon, celui-ci restant à l'état végétatif.

Le second exemple d'évolution atypique est fourni par les dicaryons 618 x 619 et 618 x 620. L'étude cytologique menée tout au long de l'évolution de ces cultures présente les caractéristiques suivantes :

- Dans les stades très jeunes (Pl. 3, fig. 3 et 4), les agrégats mycéliens sont différenciés en ébauches de carpophores, le stipe et le piléus se mettent en place. Les cellules du pied sont irrégulièrement empilées et, chez certains échantillons, l'apex est constitué par une accumulation importante de matériel cellulaire non vacuolisé. La densité de l'empilement cellulaire, à ce niveau, laisse supposer la présence d'une zone prédifférenciée en amorce hyméniale. La surface des piléus montre un amoncellement d'hyphes dicaryotiques très serrées.

A ce stade, tout comme chez les échantillons témoins, il n'existe pas d'hyménium vrai, mais seulement des articles mycéliens orientés où baignent, dans un cytoplasme commun, deux noyaux (= état dicaryotique).

- Dans les jours suivants (Pl. 3, fig. 4), les cellules du stipe et du piléus sont arrangées en strates. Le revêtement du bord externe du chapeau présente, dans la plupart des observations, une accumulation d'hyphes plus allongées et légèrement aplaties. Au niveau du sinus (étranglement stipe-piléus), les cellules binucléées s'allongent parallèlement. Dans ces fructifications, comme chez les carpophores témoins du même âge, il existe deux zones caractéristiques très riches en matériel cellulaire. L'une est au niveau du sinus et l'autre au niveau du revêtement.

- En fin de développement (Pl. 3, fig. 6), les fructifications restent mal différenciées, le pied s'est un peu allongé, le sinus est mieux marqué dans certains cas, mais le chapeau ne présente aucune mise en place des lames.

Dans la région du sinus, certains articles terminaux des hyphes disposées en palissade évoluent directement en basides porteuses de stérigmates, pourvus à leur extrémité de basidiospores uninucléées. Au niveau du revêtement du piléus, les hyphes s'organisent, arrivant perpendiculairement à la surface et s'y étalent en formant une sorte de «feutrage» tel qu'on l'observe habituellement sur les basidiocarpes.

Dans ce type de déviation, l'évolution nucléaire est en tous points semblable à celle qui est mise en évidence chez *Pleurotus eryngii* souche témoin, à fructification normale. Cependant, les basides sont très peu nombreuses et mal différenciées. Il n'existe pas d'hyménium vrai et les lames sont absentes. Des figures

de méiose ont été reconnues et les stérigmates portent des basidiospores; mais leur nombre étant faible, elles n'ont pu être récoltées.

CONCLUSION

Les observations faites tout au long de cette étude sur des cultures in vitro, à partir de spores, montrent qu'il existe une variabilité de la morphologie des basidiocarpes. A partir de dicaryons déterminés, l'obtention de fructifications normales et fertiles n'est pas toujours certaine, mais les déviations au schéma d'évolution normal peuvent avoir des origines diverses, soit sous l'influence de facteurs externes tel que le milieu de culture, soit sous l'influence de facteurs propres à chaque individu : évolution nucléaire entre autres.

Dans un article précédent, CAILLEUX et coll. (1980) ont montré qu'il existe en culture artificielle une variabilité du taux de fertilité des souches et de la morphologie des basidiocarpes lorsqu'elles sont pleinement fertiles. Ce taux de fertilité n'est pas indépendant des modalités de l'isolement des souches à partir de la population sauvage.

Les fructifications normales apparaissent sur les deux types de dicaryons $A_1B_1 \times A_2B_2$ et $A_1B_2 \times A_2B_1$.

Deux types de «blocages» se reproduisent fréquemment, le premier type est précoce et il ne conduit à aucune différenciation basidiocarpique des cultures.

Le deuxième type d'anomalie est sans rapport avec quelque perturbation nucléaire puisque les divisions se produisent normalement. L'haplonte oïdiogène 618 induit systématiquement un arrêt du développement des basidiocarpes, sans qu'il y ait de rapport strict avec quelque accident nucléaire, puisque nous avons observé, dans certains cas, les divisions méiotiques et la mitose post-méiotique. Il est également capable de former des dicaryons typiques avec d'autres myceliums haploïdes issus d'un même carpophore. Dans tous les cas où l'essai a été réalisé, il ne se diploïdise avec aucun autre haplonte de basidiocarpe d'origine géographique différente.

BIBLIOGRAPHIE

BOIDIN J., 1958 — Essai biotaxonomique sur les Hydnés Résupinés et les Corticiés. Étude spéciale du comportement nucléaire et des mycéliums. Thèse Lyon 1954. *Rev. de Mycol.*, Mém. hors sér. n° 6, 387 p.

CAILLEUX R. et DIOP A., 1976 — Recherches préliminaires sur la fructification en culture du *Pleurotus eryngii* (Fr. ex D.C.) Quélet. *Rev. de Mycol.* 40: 365-388.

CAILLEUX R. et DIOP A., 1978 — La fructification du *Pleurotus eryngii* en conditions de culture non stériles et ses incidences pratiques. *Rev. de Mycol.* 42: 1-11.

CAILLEUX R., DIOP A., SLEZEC A.M. et JOLY P., 1980 — Variabilité de la fructification du *Pleurotus eryngii* en culture. *Cryptog., Mycol.* 1, 2: 119-138.

FAYOD V., 1889 — Prodrome d'une histoire naturelle des Agaricinés. *Ann. Sci. Nat. Bot.* série 7, 9: 179-411.

HEIM R. et WASSON R.G., 1958 — Les Champignons hallucinogènes du Mexique. Ed. Mus. d'Hist. Nat., Paris.

LAMOURE D., 1958 — Étude cytologique des germinations et des myceliums de quelques Agaricales. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 74, 2 : 189-195.

MAGNUS W., 1906 — Uber die Formbildung der Hutpilze. *Arch. Biontologie* 1 : 85-158.

ODDOUX L., 1955 — Recherches sur les myceliums secondaires des Homobasidiés en culture pure. Morphologie, cytologie, exigence alimentaire. Thèse Lyon, 346 p.

REIJNDERS A.F.M., 1963 — Les problèmes du développement des carpophores des Agaricales et de quelques groupes voisins. Dr. W. Junk Den Haag, 412 p.

LÉGENDES DES PLANCHES

Planche 1. — (J + 1) à (J + 8) : Évolution du *Pleurotus eryngii* en culture, formation des fructifications. J : nombre de jours de culture.

Planche 2. — 1: *Pleurotus eryngii* récolté dans la nature. 2: *Pleurotus eryngii* obtenu in vitro. 3 et 4: Obtention de fructifications in vitro de *Pleurotus eryngii*, par semis multispores. 5 et 6 : Obtention par confrontation d'haplontes compatibles (611 x 623), de fructifications in vitro.

Planche 3. — Évolution des diplontes compatibles (622 x 623, 618 x 619 et 618 x 620), en culture. Formation des fructifications.

Planche 4. — 1 à 9 : Myceliums haploïdes et diploïdes obtenus sur milieu synthétique. 10 : Autre aspect cultural du mycélium issu du croisement 618 x 619. 11: Le mycélium haploïde est cloisonné (cl) en articles uninucléés (n). 12: Formation d'oïdies de taille variable. 13: Oïdies isolées, uni- ou plurinucléées. Figure en Y (flèche). 14: Le mycélium diploïde est cloisonné (cl) en articles binucléés (n + n) et pourvu d'anses d'anastomoses ou «boucles» (bl) aux cloisons. 15: Formation d'hyphes acrémoniformes.

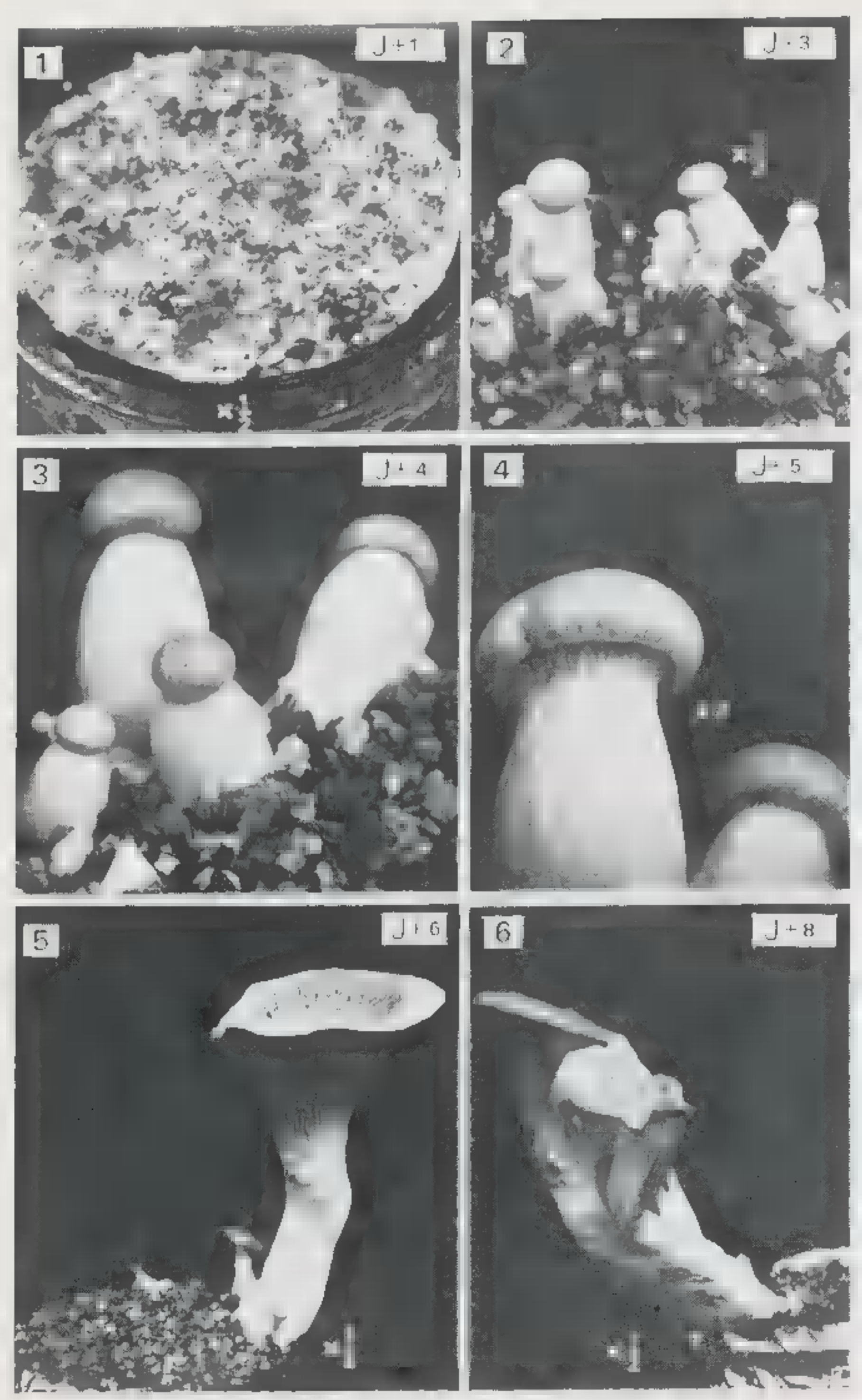


Planche 1

1

2

3 J+4

×1/3

4 J+8

5 J+2 611×623

×1/3

6 J+6 611×623

Planche 2

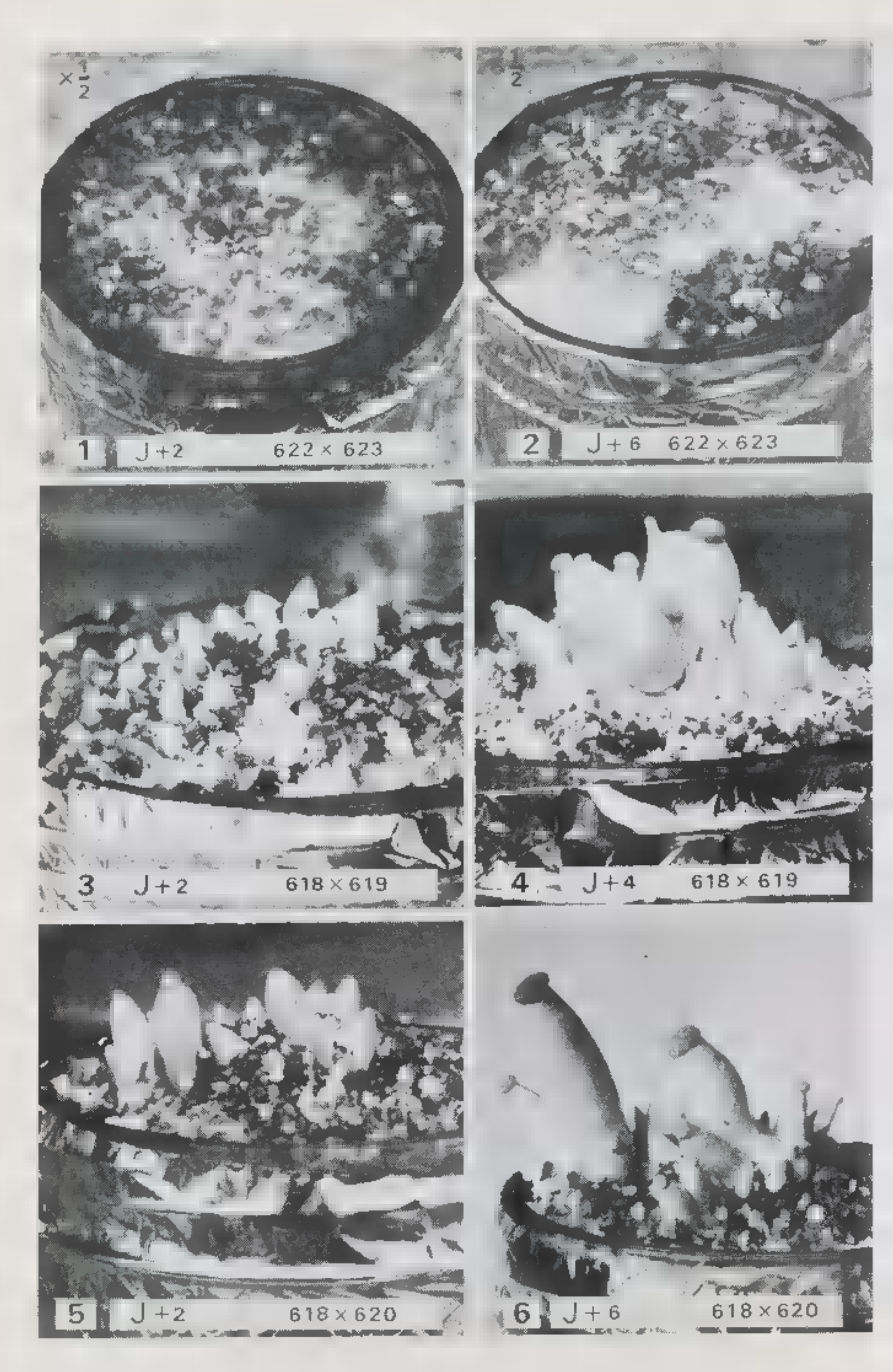

×1/2
1
J+2
622×623
1/2
2
J+6
622×623
3
J+2
618×619
4
J+4
618×619
5
J+2
618×620
6
J+6
618×620

Planche 3

1 611

2 611 623 × 1/2

3 618

4 618 619

5 620

6 618 620

7 622

8 622 623

9 623

10 618 619

11 cl n × 200

12 × 400

13 × 400

14 b n n cl × 1000

15 × 400

Planche 4

